

УДК 577.15 : 577.153.4

КОМБИНИРОВАННЫЙ ВИД ИНГИБИРОВАНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

А. П. Бресткин, Н. Н. Годовиков

Обзор посвящен исследованию проявления фосфорорганическими соединениями комбинированного вида ингибирования каталитической активности холинэстераз. Показано, что этот вид ингибирования существенно зависит от наличия гидрофобных заместителей в молекуле фосфорорганического соединения. Высказано предположение о возможности «согласованной» или «несогласованной» сорбции гидрофобных группировок ингибитора на гидрофобных участках, находящихся вблизи анионного и эстеразного пунктов активной поверхности холинэстераз. Эти эффекты, по-видимому, определяют характер ингибирования холинэстераз.

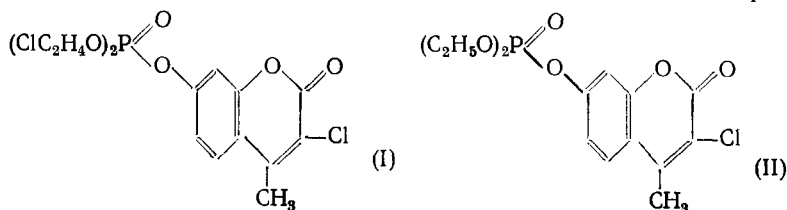
Библиография — 44 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|------|
| I. Введение | 1609 |
| II. Взаимодействие холинэстераз с эфирами дифенилтиофосфоновой кислоты | 1611 |
| III. Реакции холинэстераз с тиоэфирами фенилтиофосфоновой, циклогексилтиофосфоновой и бензилфосфоновой кислот | 1615 |
| IV. Взаимодействие холинэстераз с тиоэфирами диалкилфосфиновых кислот | 1619 |
| V. Заключение | 1623 |

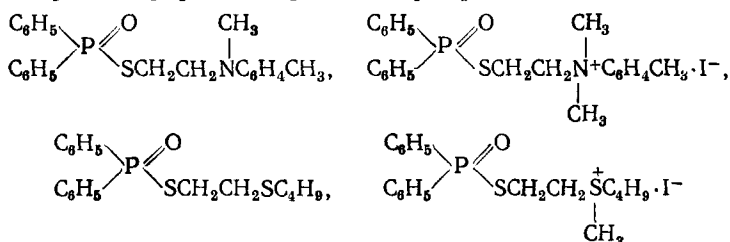
I. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эфиры кислот пятивалентного фосфора, обладающие фосфорилирующей способностью, могут ингибировать холинэстеразы — жизненно важные ферменты, регулирующие передачу нервного возбуждения с нерва на иннервируемую клетку. До недавнего времени считалось, что фосфорорганические соединения могут ингибировать холинэстеразы только необратимо, фосфорилируя гидроксил серина, входящий в состав эстеразного центра этих ферментов. Однако в 1969 г. Олдридж и Рейнер¹ в опытах с (I) и (II) кумаринилфосфатами обнаружили два вида торможения каталитической активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эритроцитов быка: а) необратимое, прогрессирующее во времени и обусловленное фосфорилированием активного центра фермента; б) обратимое, мгновенно устанавливающееся и не прогрессирующее во времени. По мнению авторов¹, последний тип ингибирования

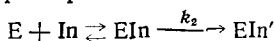


связан с взаимодействием фосфорорганического ингибитора (ФОИ) с участком активной поверхности фермента, ответственным за торможение активности АХЭ избытком субстрата.

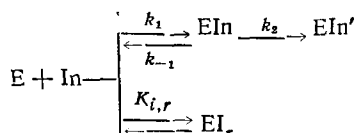
В 1971 г. подобный сложный вид ингибирования каталитической активности наблюдали М. И. Кабачник с сотр.² на примере другого фермента—бутирилхолинэстеразы (БухЭ) сыворотки крови лошади в опытах с некоторыми эфирами дифенилтиофосфиновой кислоты:



Поскольку для БухЭ не свойственно торможение активности избытком субстрата, то наличие обратимой составляющей в ингибировании фермента авторы² объясняют возможностью «непродуктивной» сорбции ингибитора на активной поверхности фермента (Е), при которой не происходит благоприятной для фосфорилирования гидроксила серина ориентации ингибитора на активной поверхности БухЭ. Как предположили авторы, образующийся при этом фермент — ингибиторный комплекс (ЕI_г), в отличие от обычного комплекса типа комплекса Михаэлиса (ЕIn), не способен к последующему превращению в фосфорилированный фермент (ЕIn'): он аналогичен фермент-ингибиторному комплексу, который получается при действии на холинэстеразы обратимых ингибиторов, например тетраалкиламмониевых ионов*. Иначе говоря, вместо обычной схемы фосфорилирования



для этого сложного, так называемого комбинированного вида торможения была предложена схема²:



где k_1 , k_{-1} , k_2 — константы скорости соответствующих ступеней реакции, а $K_{i,r}$ — равновесная константа диссоциации «непродуктивного» комплекса ЕI_г.

Комбинированный вид торможения проявляется прежде всего в том, что при повышении концентрации ингибитора [In] наблюдается существенное уменьшение экспериментальной бимолекулярной константы скорости фосфорилирования фермента k_{II} , вычисляемой по уравнению:

$$k_{II} = \frac{1}{[\text{In}] t} \ln (v_0/v_t),$$

где v_0 — скорость ферментативного гидролиза субстрата в отсутствие ингибитора, а v_t — скорость (через t мин) инкубации фермента с ингибитором S, концентрация которого во много раз больше концентрации фермента. Обратимое торможение для этих соединений проявляется как в реакции фосфорилирования фермента, где оно оценивается равновесной

* В настоящее время имеющийся большой экспериментальный материал позволяет сделать предположение, что комплекс ЕI_г не отличается существенно от комплекса ЕIn и может представлять собой часть фермент-ингибиторного комплекса не вступившего в реакцию фосфорилирования фермента. Поэтому в дальнейшем комплекс ЕI_г мы будем рассматривать как «непродуктивный», а комплекс ЕIn — как «продуктивный».

ингибиторной константой $K_{i,r}$, так и в реакции ферментативного гидролиза субстрата — ацетилхолина, где оно оценивается константой $K_{i,s}$.

Наиболее надежным показателем комбинированного вида торможения является понижение каталитической активности фермента при $t \rightarrow 0$.

Для вычисления констант скорости необратимого ингибирования БУХЭ и АХЭ и равновесных констант $K_{i,s}$, $K_{i,r}$ использовались следующие уравнения²:

$$k = \frac{1}{[\text{In}] t} \left(\ln \frac{v_0}{v_t} - \ln \frac{v_0}{v_{0,t}} \right),$$

где k — экспериментальная бимолекулярная константа скорости при данном значении t , $v_{0,t}$ — скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина в присутствии ингибитора при равном нулю времени инкубации с ферментом

$$K_{i,s} = \frac{K_m}{(K_m + [S])[v_0/(v_{0,i} - 1)]},$$

где K_m — константа Михаэлиса, $[S]$ — концентрация субстрата. Из значений k при различных $[\text{In}]$ графическим методом определяли истинную бимолекулярную константу k_a , не зависящую от концентрации ингибитора, и ингибиторную константу $K_{i,r}$, используя соотношение:

$$k = \frac{k_a}{1 + K_{i,r}}.$$

При исследовании кинетики взаимодействия БУХЭ с эфирами дифенилтиофосфиновой кислоты² получены данные, которые находятся в хорошем согласии со схемой (2) и с вытекающими из нее уравнениями. Эта первая работа положила начало подробному изучению связи между химической природой ФОИ и их способностью ингибировать холинэстеразы по комбинированному виду.

Были использованы препараты бутирилхолинэстеразы (БУХЭ, КФ 3.1.1.3) из сыворотки крови лошади и ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) эритроцитов крови человека. Активность ферментов определяли по скорости гидролиза ацетилхолинхлорида или ацетилхолиниодида (АХ).

Скорость гидролиза АХ под действием БУХЭ и АХЭ определяли методом потенциометрического титрования образующейся в процессе реакции уксусной кислоты при постоянном значении рН (7,5 или 7,8) с использованием рН-метров со стеклянным электродом^{3,4}. При изучении торможения каталитической активности холинэстераз чисто обратимыми ингибиторами определяли ингибиторные константы K_i графическим методом⁵. Изложению результатов этих работ посвящен данный обзор.

II. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ С ЭФИРАМИ ДИФЕНИЛТИОФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Как указывалось выше, в работе² авторы исследовали торможение БУХЭ некоторыми эфирами дифенилтиофосфиновой кислоты (табл. 1).

Исследованные тиофосфинаты оказались сильными ингибиторами БУХЭ комбинированного вида действия. Полученные для них величины бимолекулярных констант скорости необратимого ингибирования близки по значению к таковым для аналогичных тиоэфиров О,О-диэтилтиофосфорной и О-этилметилтиофосфоновой кислот^{6,7}. По эффекту обратимого действия они значительно превосходят такие типичные обратимые ингибиторы, как тетраалкиламмониевые ионы⁸. Ингибиторные

ТАБЛИЦА 1

Константы ингибирования БУХЭ соединениями $(C_6H_5)_2P(O)SCH_2CH_2R$ (А)
и $(C_6H_5)_2P(O)OSCH_2CH_2R$ (Б)²

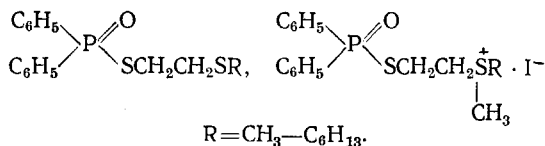
| R | $10^{-5} k_a$, л/моль·мин | $10^7 K_{i,r}$, моль/л | $10^7 K_{i,s}$, моль/л | $10^6 K_i$, моль/л |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| | А | | | Б |
| SC_4H_9 | 0,25 | 21 | 33 | 12 |
| $+S(CH_3)C_4H_9 \cdot I^-$ | 15 | 4,8 | 2,4 | 1,8 |
| $N(CH_3)C_6H_4(m-CH_3)$ | 0,05 | 0,41 | 13 | 3,9 |
| $+N(CH_3)_2C_6H_4(m-CH_3) \cdot I^-$ | 10 | 0,55 | 0,8 | 0,58 |

константы тиофосфинатов примерно на порядок ниже, чем величины K_i для их кислородных аналогов, которые являются тоже сильными, но только обратимыми ингибиторами (табл. 1). Таким образом, и тиофосфинаты, и их кислородные аналоги способны давать весьма прочные фермент-ингибиторные комплексы, вероятно благодаря наличию в их составе двух или трех фенильных групп, которые значительно усиливают гидрофобное взаимодействие ФОИ с БУХЭ, имеющей сравнительно обширные гидрофобные области как вблизи анионного, так и вблизи эстеразного пунктов⁹⁻¹¹.

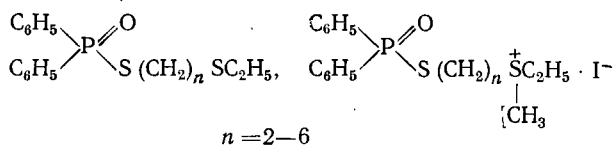
У исследованных тиофосфинатов обратимое ингибирование происходит по конкурентному типу, о чем свидетельствуют постоянство вычисленной по формуле (14) величины $K_{i,s}$ при разных $[In]$ и наличие прямой пропорциональности между $1/k$ и $[In]$. При уменьшении $[S]$ в 20 раз при данной $[In]$ угол наклона прямой к оси абсцисс сохраняется (рис. 1), а величина отрезка b уменьшается, т. е. проявляется защитная функция субстрата против обратимого ингибирования фермента, что опять-таки характерно для конкурентного типа торможения.

Наблюдается определенная взаимосвязь между величинами констант скорости фосфорилирования k_a и равновесными константами диссоциации обратимых фермент-ингибиторных комплексов ($K_{i,s}$ и $K_{i,r}$): чем больше k_a , тем меньше $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$, т. е. тем прочнее эти комплексы. Ингибиторы с катионными группировками по сравнению с «незаряженными» соединениями характеризуются большими значениями k_a и меньшими величинами $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$.

Данные, полученные при изучении ингибирующей активности S-(β-алкилмеркаптоэтил) дифенилтиофосфинатов и их иодметилатов^{12, 13} (серии Ia и IIa, табл. 2 и 3):



а также S-(ω-этилмеркаптоалкил) дифенилтиофосфинатов^{14, 15} (серии IIIa и IVa, табл. 4 и 5):



по отношению к БУХЭ продемонстрировали значительное влияние гидрофобных взаимодействий на эффект комбинированного ингибирования.

ТАБЛИЦА 2

Константы ингибирования БУХЭ соединениями $(C_6H_5)_2P(O)SCH_2CH_2SR$ (серия Ia) и $(C_6H_5)_2P(O)OCH_2CH_2SR$ (серия Ib)¹³

| R | $10^{-4} k_a$, л/моль·мин | $10^6 K_{i,r}$, моль/л | $10^6 K_{i,s}$, моль/л | $10^6 K_{i,r}$, моль/л |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | серия Ia | | | серия Ib |
| CH ₃ | 0,33 | 9,3 | 11 | 28 |
| C ₂ H ₅ | 0,42 | 7,2 | 7,3 | 23 |
| C ₃ H ₇ | 0,77 | 3,6 | 4,1 | 16 |
| C ₄ H ₉ | 2,5 | 2,1 | 3,4 | 8,4 |
| C ₅ H ₁₁ | 7,2 | 0,90 | 0,95 | 4,0 |
| C ₆ H ₁₃ | 13 | 0,55 | 0,48 | 1,2 |

ТАБЛИЦА 3

Константы ингибирования БУХЭ соединениями $(C_6H_5)_2P(O)SCH_2CH_2^+S(CH_3)R \cdot I^-$ (серия IIa) и $(C_6H_5)_2P(O)OCH_2CH_2^+S(CH_3)R \cdot I^-$ (серия IIб)¹³

| R | $10^{-5} k_a$, л/моль·мин | $10^7 K_{i,r}$, моль/л | $10^7 K_{i,s}$, моль/л | $10^6 K_{i,r}$, моль/л |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | серия IIa | | | серия IIб |
| CH ₃ | 3,0 | 14 | 6,6 | 16 |
| C ₂ H ₅ | 4,9 | 10 | 4,4 | 13 |
| C ₃ H ₇ | 6,7 | 6,1 | 2,7 | 6,7 |
| C ₄ H ₉ | 15 | 4,8 | 1,2 | 1,8 |
| C ₅ H ₁₁ | 22 | 3,1 | 0,89 | 0,94 |
| C ₆ H ₁₃ | 27 | 1,2 | 0,56 | 0,51 |

Как следует из табл. 2 и 3, при увеличении длины алкильного радикала, находящегося на атоме сульфидной или сульфониевой серы (серии Ia и IIa) наблюдается непрерывное увеличение как необратимого (повышение значений k_a), так и обратимого (понижение значений $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$) торможения каталитической активности БУХЭ¹³. Аналогичное возрастание торможения наблюдается и при увеличении расстояния между атомами

ТАБЛИЦА 4

Константы ингибирования БУХЭ соединениями $(C_6H_5)_2P(O)S(CH_2)_nSC_2H_5$ (серия IIIa) и $(C_6H_5)_2P(O)O(CH_2)_nSC_2H_5$ (серия IIIб)¹⁵

| n | $10^{-3} k_a$, л/моль·мин | $10^6 K_{i,r}$, моль/л | $10^6 K_{i,s}$, моль/л | $10^6 K_{i,r}$, моль/л |
|---|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | серия IIIa | | | серия IIIб |
| 2 | 4,2 | 7,2 | 7,3 | 23 |
| 3 | 5,5 | 3,7 | 3,2 | 20 |
| 4 | 5,0 | 1,5 | 2,1 | 14 |
| 5 | 5,2 | 1,3 | 1,6 | 7,4 |
| 6 | 4,8 | 1,2 | 0,9 | 4,8 |

ТАБЛИЦА 5

Константы ингибирования БУХЭ соединениями $(C_6H_5)_2P(O)S(CH_2)_nS^+(CH_3)C_2H_5 \cdot I^-$ (серия IVa) и $(C_6H_5)_2P(O)O(CH_2)_nS^+(CH_3)C_2H_5 \cdot I^-$ (серия IVб)¹⁵

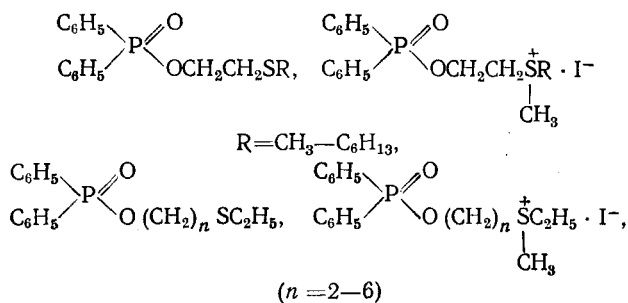
| n | $10^{-4} k_a$, л/моль·мин | $10^7 K_{i,r}$, моль/л | $10^7 K_{i,s}$, моль/л | $10^6 K_{i,r}$, моль/л |
|---|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | серия IVa | | | серия IVб |
| 2 | 49 | 10 | 4,4 | 13 |
| 3 | 6,0 | 9,2 | 3,1 | 3,0 |
| 4 | 5,3 | 6,4 | 2,9 | 2,0 |
| 5 | 3,0 | 4,8 | 2,5 | 1,6 |
| 6 | 2,5 | 4,5 | 1,9 | 1,2 |

фосфора и сульфидной или сульфониевой серой в соединениях серии IIIa и серии VIa (табл. 4 и 5)¹⁵. Характерно, что необратимое ингибирование при увеличении расстояния P — S или практически не изменяется (серия IIIa, табл. 5), или уменьшается, особенно вначале при возрастании n от 2 до 3 (табл. 5).

Из полученных данных следует, что равновесные константы $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$ действительно характеризуют образование «непродуктивного» фермент-ингибиторного комплекса EI_r, отличного от комплекса Михаэлиса (EI_n), быстро превращающегося в фосфорилированный фермент (EI_n⁺). Наиболее убедительно это показывают данные опытов с соединениями серии IVa — при увеличении n значительно повышается сорбируемость ингибитора, но вместе с тем ухудшаются условия образования «продуктивного» комплекса за счет нарастающего несоответствия величины расстояния между атомом фосфора и сульфониевой серой в молекуле ин-

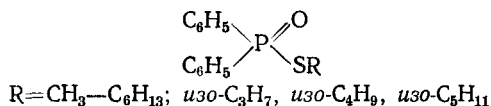
гибатора расстоянию между эстеразными и анионными пунктами каталитического центра фермента¹⁵. Влияние этого несоответствия на необратимое ингибирование обстоятельно изучено ранее на примере соединений $\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{C}_2\text{H}_5$ и их метилсульфометилатов¹⁶.

Наблюдаемое усиление сорбируемости ингибиторов на активной поверхности БУХЭ при увеличении размеров алкильного радикала, находящегося у сульфидной или сульфониевой серы соединений серий Iа и IIа и при удлинении полиметиленовой цепочки в соединениях серий IIIа и IVа происходит не за счет улучшения связывания дифенилтиофосфинатов эстеразным пунктом БУХЭ. Очевидно, оно обусловлено усилением взаимодействия ингибитора с ферментом вблизи анионного пункта. Характерно, что изменения $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$ во всех случаях коррелируют с изменением K_i соответствующих кислородных аналогов^{13, 15}



(серии Iб, IIб, IIIб, IVб, табл. 2, 3, 4 и 5), что свидетельствует о достоверности полученных данных.

Изучение антихолинэстеразной активности тиоэфиров дифенилтиофосфиновой кислоты^{17, 18} (серия V, табл. 6):



показало, что эти соединения ингибируют холинэстеразы по комбинированному типу. При этом как обратимая, так и необратимая ингибирующие активности зависят от длины и степени разветвленности алкилтиольного радикала. Так, при замене алкильных радикалов алкилтиольных групп нормального строения на разветвленные радикалы наблюдается резкое снижение как необратимой, так и обратимой антихолинэстеразной активности по отношению к АХЭ¹⁷. В опытах с БУХЭ¹⁸ такая замена наоборот повышает ингибирующую активность соединений (табл. 6). В связи с этим соединения с радикалами нормального строения сильнее ингибируют АХЭ ($k_a(\text{АХЭ})/k_a(\text{БУХЭ}) > 1$), а соединения с разветвленными радикалами сильнее ингибируют БУХЭ ($k_a(\text{АХЭ})/k_a(\text{БУХЭ}) < 1$).

Из этих результатов следует, что усиление гидрофобной сорбции ингибиторов на активной поверхности холинэстераз за счет алкилтиольной группы повышает антихолинэстеразную активность ФОИ изученных типов только тогда, когда данный эффект согласуется с гидрофобной сорбцией фенильных групп на гидрофобных участках, расположенных вблизи эстеразного пункта фермента, т. е., когда повышение активности ФОИ не ухудшает «продуктивной» сорбции ингибитора на активной поверхности фермента. Если это условие и выполняется, то вместо повышения должно происходить понижение антихолинэстеразной активности

ТАБЛИЦА 6

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $(C_6H_5)_2P(O)SR$ (серия V)¹⁸

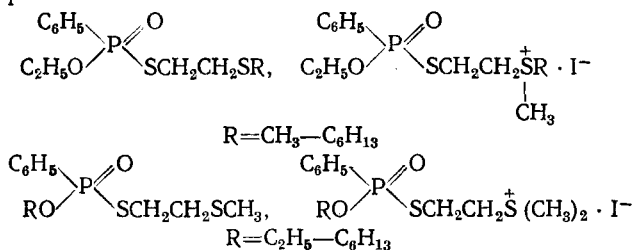
| R | $10^{-2} k_A$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, г, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л | $10^{-2} k_A$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, г, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л | $k_A(AXЭ)/$ $k_A(БухЭ)$ |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | АХЭ | | | БухЭ | | | |
| CH ₃ | 2,2 | 7,7 | 36 | 1,2 | 4,3 | 26 | 1,8 |
| C ₂ H ₅ | 4,9 | 4,6 | 19 | 1,5 | 3,5 | 14 | 3,3 |
| C ₃ H ₇ | 12 | 1,9 | 3,2 | 1,9 | 3,2 | 7,6 | 6,3 |
| C ₄ H ₉ | 25 | 0,62 | 1,3 | 2,2 | 1,8 | 5,0 | 11,4 |
| C ₆ H ₁₁ | 46 | 0,44 | 0,72 | 2,4 | 1,7 | 4,3 | 19,2 |
| C ₆ H ₁₃ | 58 | 0,29 | 0,64 | 2,5 | 1,4 | 2,8 | 23,2 |
| изо-C ₃ H ₇ | 0,3 | 50 | 50 | 2,9 | 4,5 | 16 | 0,10 |
| изо-C ₄ H ₉ | 0,5 | 14 | 14 | 8,5 | 3,7 | 6,1 | 0,06 |
| изо-C ₆ H ₁₁ | 0,7 | 82 | 8,2 | 27 | 2,2 | 3,2 | 0,026 |

вследствие «непродуктивной» сорбции, что имеет место при взаимодействии АХЭ с ФОИ, имеющими разветвленные алкилтиольные радикалы¹⁷.

В целом результаты опытов с эфирами дифенилтиофосфиновой кислоты подтверждают существующие представления о «продуктивной» и «непродуктивной» сорбции, разработанные для выяснения причин избирательности каталитического действия химотрипсина^{19, 20} и холинэстераз^{21, 22}.

III. РЕАКЦИИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ С ТИОЭФИРАМИ ФЕНИЛТИОФОСФОНОВОЙ, ЦИКЛОГЕКСИЛТИОФОСФОНОВОЙ И БЕНЗИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТ

Для изучения влияния гидрофобной сорбции на проявление ФОИ комбинированного торможения были синтезированы различные эфиры фенилтиофосфоновой кислоты^{23, 24}:



и изучена их антихолинэстеразная активность. Эти соединения отличаются от рассмотренных выше тем, что они содержат у атома фосфора вместо объемистой фенильной группы алкоксильную группу нормального строения (табл. 7, 8).

ТАБЛИЦА 7

Константы скорости ($10^{-4} k_{II}$, л/моль·мин) ингибирования холинэстераз соединениями $C_6H_5(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2SR$ (серия VI)²⁵

| R | АХЭ | БухЭ | R | АХЭ | БухЭ |
|-------------------------------|-----|------|--------------------------------|-----|------|
| CH ₃ | 6,1 | 1,3 | C ₄ H ₉ | 23 | 66 |
| C ₂ H ₅ | 3,1 | 3,7 | C ₅ H ₁₁ | 7,1 | 19 |
| C ₃ H ₇ | 2,6 | 1,1 | C ₆ H ₁₃ | 1,7 | 15 |

ТАБЛИЦА 8

Константы скорости ($10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин) ингибирования холинэстераз соединениями $C_6H_5(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2S^+(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{I}^-$ (серия VII)²⁵

| R | АХЭ | БухЭ | R | АХЭ | БухЭ |
|-------------------------------|-----|------|--------------------------------|-----|------|
| CH ₃ | 15 | 0,63 | C ₄ H ₉ | 5,7 | 7,6 |
| C ₂ H ₅ | 7,6 | 1,8 | C ₅ H ₁₁ | 12 | 6,5 |
| C ₃ H ₇ | 11 | 5,4 | C ₆ H ₁₃ | 14 | 3,7 |

ТАБЛИЦА 9

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
 $C_6H_5(RO)P(O)SCH_2CH_2SCH_3$ (серия VIII)²⁶

| R | $10^{-4} k_{II}$, л/моль·мин | $10^8 K_i, r$, моль/л | $10^8 K_i, S$, моль/л | $10^{-4} k_{II}$, л/моль·мин | $10^8 K_i, r$, моль/л | $10^7 K_i, S$, моль/л |
|-------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | АХЭ | | | БуХЭ | |
| C_2H_5 | 6,1 | — | — | 1,3 | — | — |
| C_3H_7 | 5,5 | — | — | 7,4 | — | — |
| C_4H_9 | 15 | — | — | 26 | — | — |
| C_5H_{11} | 17* | 4,1 | 1,3 | 38 | 2,1 | 6,0 |
| C_6H_{13} | 19* | 2,9 | 1,5 | 74 | 3,0 | 2,3 |

* Приведены значения k_a , л/моль·мин.

Замена одного фенильного радикала в соединениях серий Ia и IIa на алкоксильную группу привела к резкому изменению характера ингибирования АХЭ и БуХЭ. В отличие от аналогичных эфиров дифенилтиофосфиновой кислоты, О-этилфенилтиофосфонаты как сульфидного (серия VI, табл. 7), так и сульфониевого типа (серия VII, табл. 8), ингибируют холинэстеразы только необратимо²⁵. Для этих веществ прямые $\lg v_0/v_t - t$ проходят через начало координат. Кроме того, найденные значения k практически не зависят

ТАБЛИЦА 10

Константы ингибирования холинэстераз
соединениями



| R | $10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин | $10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин | $10^8 K_i, r$, моль/л | $10^8 K_i, S$, моль/л |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | АХЭ | | БуХЭ | |
| C_2H_5 | 15 | 0,63 | — | — |
| C_3H_7 | 5,5 | 3,4 | — | — |
| C_4H_9 | 24 | 11 | — | — |
| C_5H_{11} | 20 | 2,2 | 1,9 | 4,8 |
| C_6H_{13} | 12 | 3,1 | 4,4 | 5,9 |

от концентрации исследованных ингибиторов. Отсутствие обратимого торможения свидетельствует о такой комплементарности соединений активному центру фермента, при которой «непродуктивная» сорбция или полностью отсутствует или выражена настолько слабо, что не регистрируется с помощью описанных методов.

Таким образом, при значительном удлинении алкилтиольного радикала, который может сорбироваться на гидрофобном участке вблизи анионного пункта,

комбинированный вид ингибирования выявить не удалось ни для АХЭ, ни для БуХЭ.

Далее была сделана попытка найти ингибиторы комбинированного вида среди соединений, аналогичных изученным выше, но имеющих алкоксильные радикалы различной длины, способные сорбироваться на гидрофобных участках вблизи эстеразного центра. В качестве таких соединений были выбраны О-алкил-S-(β-метилмеркаптоэтил)фенилтиофосфонаты (серия VIII, табл. 9) и их иодметилаты (серия IX, табл. 10)²⁶. В опытах с БуХЭ комбинированный вид ингибирования обнаружен лишь у соединений, имеющих длинные алкоксильные радикалы (C_5H_{11} , C_6H_{13}). У соединений с более короткими алкоксильными группами наблюдалось только необратимое ингибирование²⁶. В опытах с АХЭ обратимая составляющая выявлена только для двух последних соединений сульфидного ряда (серия VIII, табл. 9). Вещества сульфониевого ряда (серия IX) проявляли лишь необратимое ингибирование (табл. 10). Это позволило сделать вывод, что в случае АХЭ повышение склонности ингибитора к гидрофобной сорбции на активной поверхности фермента как

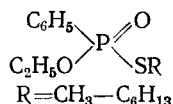
ТАБЛИЦА 11

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $C_6H_5(C_2H_5O)P(O)SR$ (серия X)²⁷

| R | $10^{-3} k_a$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, r, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л | $10^{-3} k_a$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, r, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | АХЭ | | | БуХЭ | |
| CH_3 | 0,29 | 76 | 6,3 | 1,0 | 20 | 5,0 |
| C_2H_5 | 0,38 | 11 | 11 | 0,14 | 150 | 6,1 |
| C_3H_7 | 0,26 | 51 | 15 | 0,28 | 29 | 5,7 |
| C_4H_9 | 0,58 | 29 | 8,0 | 0,77 | 12 | 2,6 |
| C_5H_{11} | 1,15 | 5,7 | 1,8 | 4,5 | 4,5 | 0,64 |
| C_6H_{13} | 2,10 | 2,2 | 3,0 | 51 | 0,62 | 0,62 |

вблизи анионного, так и вблизи эстеразного пунктов не сопровождается образованием «непродуктивного» фермент-ингибиторного комплекса так же, как и в случае БуХЭ²⁶.

При исследовании антихолинэстеразной активности тиоэфиров фенилтиофосфоновой кислоты, не содержащих в алктиольном радикале каких-либо полярных группировок



(серия X, табл. 11), выявилось влияние отщепляемой части молекулы ФОИ на характер антихолинэстеразного действия²⁷. Все соединения этой серии в отличие от О-этил-S-(β-алкилмеркаптоэтил)фенилтиофосфонатов и их йодметилатов (серия VI—IX) ингибировали АХЭ и БуХЭ по комбинированному типу. Очевидно, отсутствие у соединений серий X дипольной и особенно катионной группировок в отщепляемой части молекулы, с одной стороны, ухудшает условия правильной ориентации молекул на активной поверхности фермента, а, с другой стороны, уменьшает электрофильную фосфорилирующую способность; это приводит к четко выявляемому комбинированному виду торможения каталитической активности холинэстераз.

Однако дипольные и катионные группировки в отщепляемой части молекулы ФОИ далеко не всегда способны обеспечить «продуктивную» сорбцию. Это проявилось не только у эфиров дифенилтиофосфиновой кислоты, но и у двух эфиров фенилтиофосфоновой кислоты (табл. 9, 10). В первом случае ориентирующему влиянию меркаптогруппы мешали

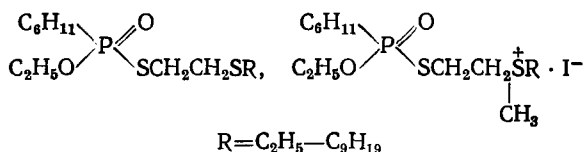
ТАБЛИЦА 12

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $C_6H_{11}(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2SR$ (серия XI)³⁰

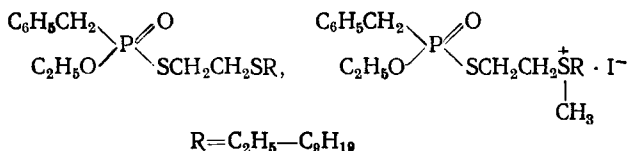
| R | $10^{-3} k_a$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, r, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л | $10^{-3} k_a$, л/моль·мин | $10^5 K_i$, r, моль/л | $10^5 K_i$, S, моль/л |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | АХЭ | | | БуХЭ | |
| C_2H_5 | 1,5 | 29 | 9,7 | 0,65 | 13 | 28 |
| C_3H_7 | 2,8 | 8,0 | 4,8 | 6,3 | 2,0 | 17 |
| C_4H_9 | 4,0 | 6,0 | 6,6 | 25 | 0,9 | 1,4 |
| C_5H_{11} | 2,9 | 7,2 | 3,7 | 23 | 1,0 | 3,1 |
| C_6H_{13} | 15 | 1,0 | 2,9 | 48 | 0,53 | 2,5 |
| C_7H_{15} | 8,3 | 2,0 | 6,3 | 5,7 | 2,2 | 7,9 |
| C_8H_{17} | 9,5 | 1,3 | 1,5 | 16 | 0,45 | 0,73 |
| C_9H_{19} | 15 | 0,3 | 1,3 | 5,0 | 0,29 | 0,89 |

два фенильных радикала, во втором — фенильный и алкоксильный радикалы, при алкильных группах C_5H_{11} и C_6H_{13} . При меньших алкильных группах наблюдалась согласованность в сорбции фосфорильной части и меркаптогруппы и обратимая составляющая в ингибирующем действии ФОИ отсутствовала.

Влияние гидрофобных заместителей, находящихся у атома фосфора, на проявление ФОИ комбинированного вида ингибирования холинэстераз была исследована также на примерах ряда тиоэфиров циклогексилтиофосфоновой кислоты²⁸ (серии XI и XII, табл. 12, 13):



и тиоэфиров бензилтиофосфоновой кислоты²⁹ (серии XIII и XIV, табл. 14, 15):



Оказалось, что наличие у атома фосфора циклогексильной группы вместо фенильной в случае соединений сульфидного типа приводит к резко

ТАБЛИЦА 13

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
 $C_6H_{11}(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2S^+(CH_3)R \cdot I^-$
 (серия XII)³⁰

| R | $10^{-3} k_{II},$ л/моль·мин | $10^{-3} k_a,$ л/моль·мин | $10^3 K_i, r,$ моль/л | $10^3 K_i, s,$ моль/л |
|-------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| АХЭ | | | БУХЭ | |
| C_6H_5 | 1,0 | 0,57 | 14 | 70 |
| C_3H_7 | 0,7 | 0,84 | 5,8 | 63 |
| C_4H_9 | 1,1 | 9,5 | 0,42 | 8,4 |
| C_6H_{11} | 3,3 | 16 | 1,5 | 12 |
| C_6H_{13} | 9,4 | 12 | 5,2 | 25 |
| C_7H_{15} | 10 | 7,8 | 5,0 | 20 |
| C_8H_{17} | 12 | 3,9 | 1,4 | 11 |
| C_9H_{19} | 2,8 | 2,5 | 0,85 | 9 |

ко выраженному комбинированному виду ингибирования БУХЭ (табл. 12)³⁰. Аналогичный эффект для БУХЭ наблюдается и у соответствующих тиоэфиров бензилтиофосфоновой кислоты (табл. 14)³¹, причем последние соединения более активны, чем производные циклогексилтиофосфоновой кислоты³⁰.

Взаимодействие тиоэфиров циклогексилтиофосфоновой и бензилтиофосфоновой кислоты ониевого типа (серии XII и XIV, табл. 13 и 15) с БУХЭ проходит иначе. Ингибиторами комбинированного типа в этом

случае являются лишь производные циклогексилтиофосфоновой кислоты (табл. 13)³⁰. Тиоэфиры бензилтиофосфоновой кислоты ониевого типа ингибируют БУХЭ только необратимо (табл. 14)³¹.

В опытах с АХЭ во всех случаях наблюдается лишь необратимое ингибирование (табл. 13 и 15). Эти данные, а также полученные при изучении аналогичных тиоэфиров фенилтиофосфоновой кислоты (серии VI—IX) результаты показывают, что комбинированному виду ингибирования каталитической активности холинэстераз в большинстве случаев способствует наличие в молекуле ингибитора гидрофобных группировок, особенно находящихся в фосфорилирующей части молекулы, и препятствует наличие полярных групп. Наиболее четко это проявляется в случае АХЭ.

ТАБЛИЦА 14

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
 $C_6H_5CH_2(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2SR$ (серия XIII)³¹

| R | $10^{-4} k_d$, л/моль·мин | $10^6 K_i$, г, моль/л | $10^6 K_i$, г, моль/л | $10^{-5} k_d$, л/моль·мин | $10^7 K_i$, г, моль/л | $10^6 K_i$, г, моль/л |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | АХЭ | | | БуХЭ | |
| C_2H_5 | 1,5 | 25 | 19 | 0,74 | 85 | 95 |
| C_3H_7 | 2,6 | 14 | 16 | 7,5 | 59 | 69 |
| C_4H_9 | 2,9 | 19 | 12 | 27 | 2,5 | 3,2 |
| C_5H_{11} | 1,3 | 23 | 21 | 19 | 8,9 | 4,1 |
| C_6H_{13} | 3,3 | 9,8 | 8,3 | 18 | 7,2 | 5,6 |
| C_7H_{15} | 21 | 1,0 | 1,9 | 6,5 | 9,5 | 7,0 |
| C_8H_{17} | 22 | 3,6 | 2,2 | 22 | 16 | 6,5 |
| C_9H_{19} | 24 | 3,2 | 1,9 | 13 | 12 | 4,9 |

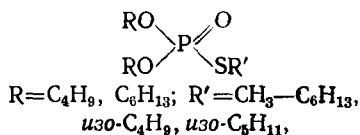
ТАБЛИЦА 15

Константы скорости ($10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин) ингибирования
 холинэстераз соединениями
 $C_6H_5CH_2(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2S^+(CH_3)R \cdot I^-$ (серия XIV)³¹

| R | АХЭ | БуХЭ | R | АХЭ | БуХЭ |
|-------------|------|------|-------------|------|------|
| C_2H_5 | 1,0 | 6,5 | C_6H_{13} | 0,94 | 8,2 |
| C_3H_7 | 0,82 | 21 | C_7H_{15} | 1,4 | 13 |
| C_4H_9 | 1,2 | 12 | C_8H_{17} | 1,6 | 88 |
| C_5H_{11} | 1,3 | 34 | C_9H_{19} | 2,8 | 12 |

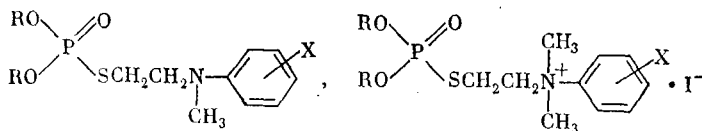
IV. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ С ТИОЭФИРАМИ ДИАЛКИЛТИОФОСФОРНЫХ КИСЛОТ

Комбинированное ингибирование холинэстераз проявляется не только при наличии у атома фосфора объемистых гидрофобных радикалов. Этот эффект четко выявляется в тех случаях, когда у атома фосфора находятся две алкоксильные группы. Так, по комбинированному типу ингибируют холинэстеразы О,О-диалкил-S-алкилтиофосфаты:



имеющие у атома фосфора две бутоксильные³² и две гексоксильные³³ группы (серии XV и XVI, табл. 16 и 17), причем обратимая составляющая во всех случаях в большей степени выражена у БуХЭ, чем у АХЭ.

Комбинированный вид ингибирования каталитической активности холинэстераз, по-видимому, достаточно характерен для тиоэфиров тиофосфорных кислот, даже при наличии у атома фосфора небольших алкоксильных радикалов. Это было показано на примерах ряда О,О-диалкил-S-(β,N,N-арилметиламиноэтил)тиофосфатов и их иодметилатов^{34, 35}:



$R=C_3H_7, C_4H_9, \text{изо-C}_3H_7; X=H, n-, m-CH_3; n-, m-CH_3O, n-, m-Cl$

ТАБЛИЦА 16

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $(C_4H_9O)_2P(O)SR$
(серия XVI)³²

| R | $10^{-4} k_a$, л/моль·мин | $10^8 K_i$, г, моль/л | $10^8 K_i$, S, моль/л | $10^{-5} k_a$, л/моль·мин | $10^7 K_i$, г, моль/л | $10^7 K_i$, S, моль/л |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | АХЭ | | | БухЭ | | |
| CH ₃ | 0,75 | 34 | 11 | 0,12 | 27 | 11 |
| C ₂ H ₅ | 1,2 | 19 | 31 | 0,13 | 16 | 31 |
| C ₃ H ₇ | 0,85 | 31 | 24 | 0,86 | 33 | 14 |
| C ₄ H ₉ | 1,2 | 4,5 | 9,9 | 3,2 | 7,1 | 5,5 |
| C ₅ H ₁₁ | 2,1 | 1,7 | 4,4 | 7,7 | 1,9 | 1,9 |
| C ₆ H ₁₃ | 2,2 | 7,5 | 3,4 | 61 | 0,1 | 0,26 |
| изо-C ₄ H ₉ | 2,4 | 31 | 4,7 | 6,2 | 1,6 | 1,4 |
| изо-C ₆ H ₁₁ | 9,4 | 18 | 3,7 | 2,0 | 16 | 1,0 |

ТАБЛИЦА 17

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $(C_6H_{13}O)_2P(O)SR$
(серия XVI)³³

| R | $10^{-5} k_a$, л/моль·мин | $10^8 K_i$, г, моль/л | $10^8 K_i$, S, моль/л | $10^{-5} k_a$, л/моль·мин | $10^7 K_i$, г, моль/л | $10^7 K_i$, S, моль/л |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | АХЭ | | | БухЭ | | |
| CH ₃ | 4,9 | 43 | 2,4 | 4,5 | 3,9 | 2,2 |
| C ₂ H ₅ | 3,3 | 79 | 30 | 1,2 | 31 | 0,64 |
| C ₃ H ₇ | 13 | 3,7 | 4,9 | 3,3 | 1,7 | 1,2 |
| C ₄ H ₉ | 21 | 1,9 | 2,6 | 2,8 | 6,0 | 1,1 |
| C ₅ H ₁₁ | 14 | 1,9 | 1,9 | 1,3 | 42 | 2,7 |
| C ₆ H ₁₃ | 8,1 | 2,3 | 2,4 | 2,1 | 7,8 | 4,6 |
| изо-C ₄ H ₉ | 5,3 | 5,0 | 4,2 | 1,0 | 40 | 4,8 |
| изо-C ₆ H ₁₁ | 15 | 2,1 | 1,5 | 5,9 | 2,9 | 1,6 |

ТАБЛИЦА 18

Константы ингибирования холинэстераз
соединениями
 $(C_3H_7O)_2P(O)SCH_2CH_2N(CH_3)C_6H_4R$
(серия XVII)³⁶

| X | $10^{-6} k_{II}$, л/моль·мин | $10^7 K_i$, S, моль/л | $10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин | $10^8 K_i$, S, моль/л |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| | АХЭ | | БухЭ | |
| n-OCH ₃ | 0,9 | 10,2 | 0,2 | 6,8 |
| n-CH ₃ | 1,6 | 7,6 | 0,7 | 2,2 |
| m-CH ₃ | 1,8 | 5,5 | 0,8 | 2,8 |
| H | 1,7 | 8,5 | 1,6 | 1,0 |
| m-OCH ₃ | 1,5 | 7,5 | 0,9 | 2,2 |
| n-Cl | 4,7 | 1,7 | 1,3 | 1,0 |
| m-Cl | 3,1 | 3,4 | 2,1 | 1,2 |

ТАБЛИЦА 19

Константы ингибирования холинэстераз
соединениями
 $(C_4H_9O)_2P(O)SCH_2CH_2N(CH_3)C_6H_4X$
(серия XVIII)³⁷

| X | $10^{-6} k_{II}$, л/моль·мин | $10^7 K_i$, S, моль/л | $10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин | $10^8 K_i$, S, моль/л |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| | АХЭ | | БухЭ | |
| n-OCH ₃ | 2,7 | 2,3 | 0,6 | 1,6 |
| n-CH ₃ | 13 | 1,5 | 2,5 | 6,9 |
| m-CH ₃ | 4,7 | 3,2 | 2,7 | 5,7 |
| H | 6,8 | 2,6 | 2,0 | 9,0 |
| m-OCH ₃ | 3,2 | 3,9 | 4,3 | 2,1 |
| n-Cl | 12 | 0,9 | 3,0 | 3,5 |
| m-Cl | 5,4 | 2,6 | 2,6 | 3,7 |

Оказалось, что ФОИ указанного типа, имеющие у атома фосфора алкоксильные радикалы нормального строения, являются комбинированными ингибиторами^{36, 37}. Это относится как к «незаряженным» соединениям (серии XVII—XVIII, табл. 18, 19), так и к соединениям ониевого

ТАБЛИЦА 20

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
(C₃H₇O)₂P(O)SCH₂CH₂N⁺(CH₃)₂C₆H₄R·I⁻
(серия XIX)³⁶

| X | 10 ⁻⁷ k _{II} , л/моль·мин | 10 ⁶ K _i , S, моль/л | 10 ⁻⁸ k _{II} , л/моль·мин | 10 ¹⁰ K _i , S, моль/л |
|----------------------------|--|---|--|--|
| | АХЭ | | БуХЭ | |
| <i>n</i> -OCH ₃ | 1,5 | 9,8 | 2,1 | 3,3 |
| <i>n</i> -CH ₃ | 3,6 | 3,3 | 2,8 | 1,8 |
| <i>m</i> -CH ₃ | 2,6 | 5,5 | 3,1 | 2,1 |
| H | 2,8 | 3,2 | 6,4 | 2,8 |
| <i>m</i> -OCH ₃ | 2,2 | 18 | 3,6 | 1,9 |

ТАБЛИЦА 21

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
(C₄H₉O)₂P(O)SCH₂CH₂N⁺(CH₃)₂C₆H₄R·I⁻
(серия XX)³⁷

| X | 10 ⁻⁷ k _{II} , л/моль·мин | 10 ⁶ K _i , S, моль/л | 10 ⁻⁸ k _{II} , л/моль·мин | 10 ¹⁰ K _i , S, моль/л |
|----------------------------|--|---|--|--|
| | АХЭ | | БуХЭ | |
| <i>n</i> -OCH ₃ | 2,6 | 4,1 | 2,6 | 2,5 |
| <i>n</i> -CH ₃ | 6,1 | 1,7 | 3,6 | 3,6 |
| <i>m</i> -CH ₃ | 3,7 | 3,2 | 4,9 | 2,6 |
| H | 6,3 | 1,9 | 6,2 | 7,4 |
| <i>m</i> -OCH ₃ | 4,2 | 2,6 | 3,2 | 2,1 |

ТАБЛИЦА 22

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
(*изо*-C₃H₇O)₂P(O)SCH₂CH₂N(CH₃)C₆H₄R (серия XXI)³⁸

| R | 10 ⁻⁸ k _a , л/моль·мин | 10 ⁶ K _i , r, моль/л | 10 ⁶ K _i , S, моль/л | 10 ⁻⁸ k _a , л/моль·мин | 10 ⁷ K _i , r, моль/л | 10 ⁷ K _i , S, моль/л |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|
| | АХЭ | | | БуХЭ | | |
| <i>n</i> -OCH ₃ | 2,5 | 77 | 32 | 1,0 | — | — |
| <i>n</i> -CH ₃ | 4,3 | 30 | 16 | 4,2 | 25 | 4,8 |
| <i>m</i> -CH ₃ | 3,7 | 32 | 9,4 | 2,4 | 29 | 10 |
| H | 0,9 | 15 | 12 | 2,9 | 35 | 7,0 |
| <i>m</i> -OCH ₃ | 3,4 | 65 | 28 | 3,7 | 34 | 7,4 |
| <i>n</i> -Cl | 43 | 13 | 2,6 | 64 | 0,18 | 0,31 |
| <i>m</i> -Cl | 45 | 0,46 | 2,3 | 40 | 5,0 | 1,0 |

ТАБЛИЦА 23

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
(*изо*-C₃H₄O)₂P(O)SCH₂CH₂N⁺(CH₃)₂C₆H₄R·I⁻
(серия XXII)³⁸

| X | 10 ⁻⁸ k _a , л/моль·мин | 10 ⁶ K _i , r, моль/л | 10 ⁷ K _i , S, моль/л | 10 ⁻⁷ k _{II} , л/моль·мин |
|----------------------------|---|---|---|--|
| | АХЭ | | БуХЭ | |
| <i>n</i> -OCH ₃ | 12 | — | — | 2,3 |
| <i>n</i> -CH ₃ | 16 | — | — | 12 |
| <i>m</i> -CH ₃ | 30 | 1,4 | 0,5 | 8,1 |
| H | 9,3 | 5,5 | 1,0 | 5,8 |
| <i>m</i> -OCH ₃ | 29 | 2,4 | 62 | 13 |

ТАБЛИЦА 24

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
(RO)₂P(O)SCH₂CH₂N(CH₃)C₆H₁₁
(серия XXIII)³⁹

| X | 10 ⁻⁸ k _a , л/моль·мин | 10 ⁶ K _i , r, моль/л | 10 ⁷ K _i , S, моль/л | 10 ⁻⁷ k _{II} , л/моль·мин |
|---|---|---|---|--|
| | АХЭ | | БуХЭ | |
| C ₂ H ₅ | 4,6 | — | — | 3,2 |
| C ₃ H ₇ | 24 | — | — | 42 |
| <i>изо</i> -C ₃ H ₇ | 0,18 | 30 | 51 | 1,3 |
| C ₄ H ₉ | 35 | 0,34 | 0,19 | 22 |

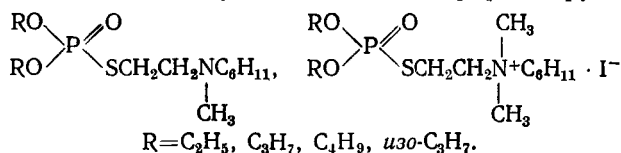
типа (серии XIX и XX, табл. 20 и 21). Во всех случаях комбинированный вид ингибирования проявляется в большей степени у БуХЭ, чем у АХЭ.

При наличии у атома фосфора двух разветвленных изопропоксильных групп комбинированный вид ингибирования обнаруживается не во всех случаях³⁸. Так, обратимая компонента выявляется при ингибировании

АХЭ и БуХЭ только для «незаряженных» соединений (серия XXI, табл. 22). Исключение составляет лишь *n*-метоксипроизводное, которое ингибирует БуХЭ только необратимо. У соединений ониевого типа комбинированный вид ингибирования проявляется лишь для некоторых ФОИ по отношению к АХЭ; БуХЭ эти соединения ингибируют только необратимо³⁸ (серия XXII, табл. 23).

Таким образом, в ряду тиоэфиров диалкилтиофосфорных кислот, в отличие от тиоэфиров тиофосфоновых кислот, БуХЭ не всегда более склонна к ингибированию по комбинированному типу.

Аналогичные результаты получены также и в опытах с тиоэфирами диалкилтиофосфоновых кислот, содержащих циклогексильную группу у атома азота, находящегося в β-положении тиоэфирной группы³⁹:



В случае соединений, имеющих у атома фосфора изопропоксильные или *n*-бутоксильные группы, комбинированный вид ингибирования проявляется только по отношению к АХЭ, причем этот эффект наблюдался как у «незаряженных» соединений (серия XXIII, табл. 24), так и у иод-

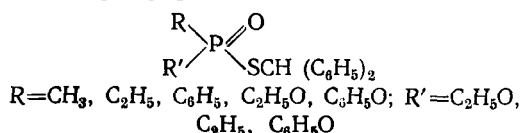
ТАБЛИЦА 25

Константы ингибирования холинэстераз соединениями $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_{11} \cdot \text{I}^-$ (серия XXIV)³⁹

| R | $10^{-6} k_d$, л/моль·мин | $10^5 K_I$, г, моль/л | $10^5 K_I$, г, моль/л | $10^{-7} k_{II}$, л/моль·мин |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | АХЭ | | | БуХЭ |
| C_2H_5 | 2,0 | — | — | 6,3 |
| C_3H_7 | 0,1 | — | — | 67 |
| изо- C_3H_7 | 13 | 1,4 | 1,1 | 5,0 |
| C_4H_9 | 0,13 | $3,0 \cdot 10^{-3}$ | $6,3 \cdot 10^{-3}$ | 43 |

метилатов (серия XXIV, табл. 25). По отношению к БуХЭ фосфорорганические ингибиторы указанных типов проявляли лишь необратимый вид ингибирования.

Приведенные выше экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что комбинированному виду торможения каталитической активности холинэстераз в наибольшей степени способствуют гидрофобные заместители, находящиеся в фосфорилирующей части молекулы ФОИ. Однако имеются также примеры, когда определяющее влияние оказывают заместители, находящиеся в отщепляющейся части молекулы ФОИ. Это было показано на примерах бензгидриловых эфиров различных тиокислот пятивалентного фосфора⁴⁰:



Склонность этих соединений проявлять комбинированный вид ингибирования по отношению к АХЭ и БуХЭ выражена очень четко даже в тех случаях, когда у атома фосфора находятся группировки с короткими гидрофобными радикалами. Наличие у атома фосфора двух фено-

ТАБЛИЦА 26

Константы ингибирования холинэстераз соединениями
 $RR'P(=O)SCH(C_6H_5)_2$ (серия XXV)⁴⁶

| R | R' | $10^{-4} k_a'$ л/моль·мин | $10^6 K_i, r'$ моль/л | $10^7 K_i, s'$ моль/л | $10^{-4} k_a'$ л/моль·мин | $10^6 K_i, r'$ моль/л | $10^7 K_i, s'$ моль/л |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | АХЭ | | | БуХЭ | | |
| CH ₃ | C ₂ H ₅ O | 49,5 | 0,99 | 9,2 | 1,62 | 6,5 | 8,3 |
| C ₂ H ₅ O | C ₂ H ₅ O | 18,4 | 0,74 | 6,75 | 9,43 | 17,7 | 8,95 |
| C ₆ H ₅ | C ₆ H ₅ | 0,143 | 100 | 34 | 0,052 | 2,15 | 78,7 |
| C ₆ H ₅ | C ₂ H ₅ O | 2,18 | 10,5 | 18 | 23 | 9,78 | 1,26 |
| C ₆ H ₅ O | C ₆ H ₅ O | — | — | 12 | 3,96 | 22,6 | 773 |

кислых групп приводит к потере способности ФОИ необратимо ингибировать АХЭ, однако БуХЭ при этом ингибируется по комбинированному типу (серия XXV, табл. 26).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что БуХЭ по сравнению с АХЭ гораздо легче ингибируется веществами, способными к гидрофобной сорбции на активной поверхности фермента. Это заключение было сделано раньше⁹⁻¹¹. В дальнейших исследованиях оно получило четкое подтверждение и развитие. В частности, выявились связи между строением ФОИ с различными гидрофобными радикалами и их ингибирующим действием на АХЭ и БуХЭ⁴¹.

Сравнение антихолинэстеразной активности представленных в обзоре дифенилтиофосфинатов, фенилтиофосфинатов, бензилтиофосфонатов, циклогексилтиофосфонатов, а также исследованных ранее метилтиофосфонатов⁷ наглядно демонстрирует различия в чувствительности АХЭ и БуХЭ к этим соединениям в зависимости от строения фосфорильной части их молекулы.

На АХЭ наиболее сильное необратимое ингибирующее действие оказывают S-алкилмеркаптоэтильные соединения, содержащие при фосфоре метильную группу. По-видимому, этот высокоспецифический фермент адаптирован к ацетилхолину и поэтому быстрее взаимодействует с веществами, содержащими группировку $CH_3-P=O$, которая имитирует группировку $CH_3-C=O$ ацетилхолина. К эфирам метилтиофосфоновой кислоты примыкают вещества с фенильной группой у фосфора. Значительно слабее ингибируют АХЭ S-алкилмеркаптоэтильные эфиры тиофосфоновых кислот с бензильной и особенно с циклогексильной группировкой у фосфора.

Таким образом, вещества типа $A(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2SR$ и $A(C_2H_5O)P(O)SCH_2CH_2\dot{S}(CH_3) \cdot I^-$ по силе необратимого ингибирования АХЭ в зависимости от строения А располагаются в следующий ряд: $CH_3 > C_6H_5 > C_6H_5CH_2 > C_6H_{11}$.

Иная картина наблюдается при действии рассматриваемых соединений на БуХЭ — фермент, гидролизующий с наибольшей скоростью не ацетилхолин, а бутирилхолин. Сульфидные производные O-этилалкилтиофосфоновой, а также и дифенилтиофосфоновой кислот располагаются по силе необратимого ингибирования в ряд: $C_6H_5CH_2(C_2H_5O) > > C_6H_5(C_2H_5O) > CH_3(C_2H_5O) > (C_6H_5)_2 > C_6H_{11}(C_2H_5O)$.

Сульфониевые производные по силе ингибирующего действия на БУХЭ располагаются в тот же ряд с одной существенной оговоркой относительно эфиров метилтиофосфоновой кислоты: их положение в ряду зависит от величины алкильного радикала R.

Представленный выше ряд действителен только при $R < C_6H_{13}$. При $R > C_6H_{13}$ ингибирующая активность метильных производных увеличивается и не уступает активности бензильных производных: $(C_2H_5O) \cdot C_6H_5CH_2 \gg (C_2H_5O)CH_3 > (C_2H_5O)C_6H_5 > (C_6H_5)_2 > (C_2H_5O)C_6H_{11}$.

Таким образом, при больших радикалах, прочно фиксирующих ингибитор вблизи анионного пункта БУХЭ в результате гидрофобного взаимодействия, для продуктивной сорбции и последующего фосфорилирования фермента «лучше» метильная или бензильная группировка А при атоме фосфора, но не фенильная или циклогексильная, напротив, при

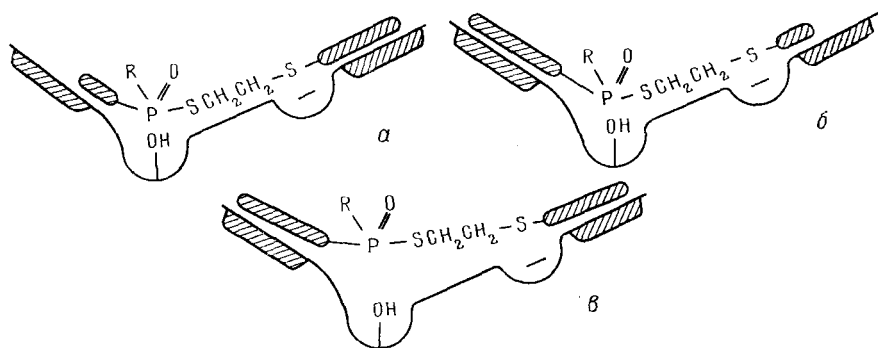


Схема «согласованной» (а, б) и «несогласованной» (в) сорбции ФОИ на активной поверхности холинэстеразы

малых радикалах — фенильная А «лучше» метильной. Комплементарность молекулы ингибитора по отношению к активной поверхности фермента, которая в конечном счете и обуславливает «продуктивную» сорбцию, в общем виде зависит от согласованности ион-ионного, ион-дипольного и гидрофобных взаимодействий, о чем упоминалось выше. При согласованности этих взаимодействий сорбированная молекула ориентируется на активном центре так, что атом фосфора и сериновый гидроксил фермента пространственно сближены, и может наступить фосфорилирование; это схематично изображено на рисунке. При «несогласованных» эффектах молекула ингибитора располагается так, что атом фосфора и сериновый гидроксил пространственно разобщены, фосфорилирование затруднено и четко проявляется комбинированный вид торможения.

При определенных структурах ингибиторов гидрофобная сорбция может способствовать правильной ориентации ингибитора на активной поверхности фермента, в результате чего скорость необратимого ингибирования возрастает. Но при других структурах сорбция может мешать «правильной» ориентации: например, в тех случаях, когда фиксированная на двух гидрофобных участках молекула ингибитора располагается так, что атом фосфора оказывается разобщенным с сериновым гидроксидом активного центра фермента. Аналогичные пространственные препятствия могут возникнуть и при действии некоторых сульфидных и сульфониевых производных, когда в результате «несогласованности» в сорбции на анионном пункте и на соответствующем гидрофобном участке сложноэфирная группировка молекулы ингибитора оказывается неправильно расположенной относительно эстеразного пункта фермента.

Эффекты такого рода, приводящие к снижению константы скорости необратимого ингибирования и появлению обратимой компоненты, видимо, наиболее ярко сказываются при наличии в молекуле ингибитора объемистых гидрофобных групп, особенно непосредственно присоединенных к атому фосфора (два фенильных, циклогексильный, бензильный радикалы).

Ранее эффекты такого рода объясняли отсутствием комплементарности гидрофобной группы ингибитора гидрофобному участку, расположенному в непосредственной близости к эстеразному пункту фермента. Теперь, в свете новых экспериментальных данных, этим эффектам следует дать уточненную трактовку. Речь должна идти о комплементарности не столько самому гидрофобному участку, сколько системе «гидрофобный участок — эстеразный пункт».

Так, было показано⁹⁻¹¹, что введение гидрофобных групп в отщепляемую или в неотщепляемую часть молекулы ингибитора усиливает его необратимое ингибирующее действие, особенно по отношению к бутирилхолинэстеразе. Теперь на основании изложенных данных можно утверждать, что введение объемистых гидрофобных групп, особенно нескольких, может привести к противоположному эффекту из-за несогласованности в ориентации молекул ингибитора на активной поверхности фермента: вместо усиления может наблюдаться ослабление антихолинэстеразной активности и появление обратимой компоненты.

Таким образом, изложенные выше данные показывают, что антихолинэстеразная активность соединений и характер их ингибирующего действия зависят от трех факторов: от электрофильной фосфорилирующей способности ингибитора, от его склонности к гидрофобной сорбции на активной поверхности фермента и от комплементарности молекулы ингибитора системе «гидрофобный участок — эстеразный центр».

Необходимо помнить, что различие между продуктивной и непродуктивной сорбцией заключается, по-видимому, лишь в локализации молекулы ингибитора на активной поверхности фермента; обеспечивающие же оба вида сорбции энергетические взаимодействия практически одни и те же. В соответствии с этим устойчивость «продуктивного» комплекса EIn и «непродуктивного» комплекса EI_r должна быть близкой. С этой точки зрения большой интерес представляют величины $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$, поскольку они могут дать представление о равновесной константе образования фермент-ингибиторного комплекса Михаэлиса. При анализе указанных величин прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что в подавляющем большинстве случаев величины $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$ для БУХЭ существенно меньше, чем для АХЭ. Это особенно отчетливо проявилось в опытах с S-алкилдифенилтиофосфинатами¹⁸, с O-этил-S-алкилфенилтиофосфонатами²⁷ и с O,O-дибутил-S-алкилтиофосфатами³², в сорбции которых гидрофобное взаимодействие играет чрезвычайно большую роль. Известно, что гидрофобное взаимодействие для БУХЭ более характерно, чем для АХЭ. Отсюда становится понятным, почему при взаимодействии с исследованными соединениями БУХЭ дает более прочные комплексы, чем АХЭ. Это должно относиться и к «непродуктивным», и к «продуктивным» комплексам.

Следует обратить внимание на тот факт, что часто имеется различие в величинах $K_{i,s}$ и $K_{i,r}$, характеризующих обратимую компоненту ингибирования холинэстераз. В большинстве случаев $K_{i,s}$ почти на порядок меньше $K_{i,r}$, т. е. ингибирующее действие некоторых соединений в реакции гидролиза ацетилхолина проявляется в большей степени, чем в реакции фосфорилирования фермента.

Одна из причин такого расхождения возможно заключается в том, что обратимое торможение в реакции ферментативного гидролиза ацетилхолина может быть связано с взаимодействием ФОИ, например по анионному пункту, не только со свободным, но и с ацетилированным ферментом. Это затрудняет деацетилирование и тем самым понижает скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина, а, следовательно, и сказывается на величине $K_{i,s}$ ⁴². Аналогичное обратимое взаимодействие ФОИ с фосфорилированным ферментом не может влиять на величину $K_{i,r}$, поскольку фосфорилированный фермент является конечным продуктом изучаемого процесса.

Вторая причина может быть связана с наличием «продуктивного» фермент-ингибиторного комплекса EIn в реакционной среде при определении скорости ферментативного гидролиза АХ, поскольку нет достаточных оснований считать, что при добавлении АХ к реакционной смеси фермента с ФОИ комплекс EIn полностью диссоциирует на ингибитор и фермент, который и катализирует гидролиз АХ. Даже в условиях, когда концентрация АХ во много раз превосходит концентрацию ФОИ, часть фермента может находиться в виде комплекса EIn, если этот комплекс очень прочный. В связи с этим при тех малых диапазонах концентраций ингибитора, используемых в экспериментах, зависимость констант скорости необратимого ингибирования k от [In] может быть или сравнительно малой или совсем отсутствовать. В последнем случае определение $K_{i,r}$ вообще невозможно.

Следует заметить, что в силу двухстадийности процесса фосфорилирования даже при отсутствии «непродуктивной» сорбции величина k должна зависеть от времени инкубации фермента с ингибитором t и от концентрации ингибитора [In], если эти параметры будут изменяться в широких пределах. На определении зависимости k от t и [I] основаны методы расчета констант скорости отдельных стадий процесса, протекающего по схеме (1)^{43, 44}.

Таким образом, комбинированный вид торможения холинэстераз некоторыми фосфорорганическими ингибиторами, который четко выявляется в экспериментах и существование которого не вызывает никакого сомнения, может быть обусловлен не только «непродуктивной» сорбцией ингибитора на ферменте, но и наличием фермент-ингибиторного комплекса в реакции ферментативного гидролиза субстрата.

Очевидно, что на уровне современной экспериментальной техники исследования взаимодействия холинэстераз с ФОИ, когда нет возможности в опытах отличать «продуктивный» фермент-ингибиторный комплекс от «непродуктивного», обратимую составляющую следует рассматривать как результат связывания фермента и в комплексе EI, и в комплексе Михаэлиса EIn.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Aldridge, E. Reiner, Biochem. J., 113, 147 (1969).
2. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, Х. Х. Гурдалиев, М. И. Кабачник, Н. А. Карданов, ДАН СССР, 200, 103 (1971).
3. В. А. Яковлев, Р. И. Волкова, Там же, 128, 848 (1959).
4. В. А. Яковлев, Р. С. Агабекян, Биохимия, 31, 258 (1962).
5. H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934).
6. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Н. Е. Теплов, ДАН СССР, 163, 365 (1965).
7. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 2028.
8. Г. М. Григорьева, В. А. Яковлев, Биохимия, 30, 875 (1965).
9. А. П. Бресткин, Н. Н. Годовиков, Е. И. Годына, М. И. Кабачник, М. Я. Михельсон, Е. В. Розенгарт, В. А. Яковлев, ДАН СССР, 158, 880 (1964).
10. М. И. Кабачник, А. А. Абдувахобов, И. И. Агабекова, А. П. Бресткин, Р. И. Вол-

- кова, Н. Н. Годовиков, Е. И. Годына, С. С. Михайлов, М. Я. Михельсон, В. И. Розенгарт, Р. В. Ситкевич, Успехи химии, 39, 1050 (1970).
11. М. I. Kabachnik, A. P. Brestkin, N. N. Godovikov, M. Ya. Michelson, E. V. Rosengart, V. I. Rosengart, Pharm. Rev., 23, 355 (1970).
 12. Н. Н. Годовиков, Н. А. Карданов, М. И. Кабачник, Ж. общ. химии, 42, 273 (1972).
 13. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Н. А. Карданов, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 622.
 14. Н. А. Карданов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Ж. общ. химии, 41, 327 (1971).
 15. Р. И. Волкова, Н. А. Карданов, А. П. Бресткин, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 2114.
 16. Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Л. Г. Магазаник, Т. А. Мاستрюкова, М. Я. Михельсон, Е. К. Рожкова, Н. К. Фруентов, В. А. Яковлев, Вopr. мед. химии, 7, 250 (1961).
 17. Р. С. Агабекян, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Г. Г. Ольховая, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 407.
 18. Р. С. Агабекян, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Г. Г. Ольховая, Там же, 1974, 450.
 19. H. T. Huang, C. Nilman, J. Chem. Soc., 74, 4634 (1952).
 20. И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, А. А. Клесов, Биохимия, 36, 227 (1971).
 21. А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт, И. П. Соболева, Н. В. Хромов-Борисов, Л. Н. Тихонова, Там же, 40, 95 (1975).
 22. А. П. Бресткин, А. Н. Касимов, Е. Б. Майзель, Е. В. Розенгарт, В. Е. Гмиро, Л. Н. Позднякова, Н. В. Хромов-Борисов, ДАН СССР, 229, 207 (1976).
 23. Н. А. Карданов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Ж. общ. химии, 41, 327 (1971).
 24. Н. Н. Годовиков, М. Х. Беканов, М. Х. Берхамов, М. И. Кабачник, Там же, 44, 1236 (1974).
 25. М. Х. Беканов, А. П. Бресткин, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, О. И. Смирнов, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 2808.
 26. М. Х. Беканов, А. П. Бресткин, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Там же, 1975, 2573.
 27. Г. Г. Ольховая, М. Х. Берхамов, Р. С. Агабекян, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Там же, 1975, 1837.
 28. М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, В. М. Кузамышев, М. И. Кабачник, Ж. общ. химии, 47, 989 (1977).
 29. В. М. Кузамышев, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, Р. С. Агабекян, В. Г. Жасминова, М. И. Кабачник, Изв. АН СССР, сер. хим., 1976, 1885.
 30. В. М. Кузамышев, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, Р. С. Агабекян, Е. Г. Киреева, З. К. Пегова, М. И. Кабачник, Там же, 1977, 1600.
 31. Р. С. Агабекян, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, В. М. Кузамышев, В. Н. Музыкантова, М. Х. Беканов, М. И. Кабачник, Там же, 1977, 1868.
 32. Г. Г. Ольховая, Р. С. Агабекян, М. Х. Берхамов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Там же, 1975, 1840.
 33. Г. Г. Ольховая, Канд. дисс., ИНЭОС АН СССР, М., 1975.
 34. Н. Н. Годовиков, Н. Е. Теплов, С. А. Трифонова, М. И. Кабачник, Ж. общ. химии, 44, 30 (1974).
 35. Н. Н. Годовиков, С. А. Трифонова, М. И. Кабачник, Там же, 44, 1011 (1974).
 36. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, И. Н. Свидрицкая, Я. С. Смусин, С. А. Трифонова, Изв. АН СССР, сер. хим., 1975, 2805.
 37. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, М. И. Кабачник, Н. И. Свидрицкая, Я. С. Смусин, С. А. Трифонова, Там же, 1974, 2811.
 38. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Е. Г. Киреева, С. А. Трифонова, Там же, 1976, 429.
 39. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Л. И. Гинецинская, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Е. Г. Киреева, С. А. Трифонова, Там же, 1973, 883.
 40. Т. А. Мастрюкова, Р. С. Агабекян, А. Б. Урюпин, М. И. Кабачник, Там же, 1977, 2317.
 41. В. М. Кузамышев, Канд. дисс. ИНЭОС АН СССР, М., 1977.
 42. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Е. В. Розенгарт, ДАН СССР, 157, 1459 (1964).
 43. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, А. А. Сагал, Там же, 167, 1381 (1966).
 44. А. П. Бресткин, К. В. Лапицкий, В. А. Самокиш, О. И. Смирнов, Там же, 219, 999 (1974).